

(19) Japanese Patent Office

(12) Publication of Unexamined Patent Application (A) (11) *Kokai* Number  
H5-276999

(43) Date of Publication: October 26, 1993

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>	Identification Symbol	JPO File Number	FI	Indicator of Technology
C12Q 1/68	ZNA A	8114-4B		
C07H 21/04	B			
C12N 15/10				
C12Q 1/04		6807-4B		
		8931-4B	C12N 15/00	A
Request for Examination: Not Requested. Number of Claims: 6 (8 Pages Total)				
Continued on last page				
(21) Application Number:	H4-80769	(71) Applicant:	000003160	
(22) Filing Date:	April 2, 1992		Toyobo Co., Ltd.	
			2-2-8 Dohjimahama, Kita-ku	
			Osaka City, Osaka	
		(72) Inventor:	Akira Matsuoka	
			1-11 Takezon-cho,	
			Ashiya City, Hyogo	
		(72) Inventor:	Shohei Kagawa	
			2-2-11-701 Higashinaruo-cho	
			Nishinomiya City, Hyogo	
		(72) Inventor:	Norimitsu Otsuka	
			3-10-4 Satonaka-cho	
			Nishinomiya City, Hyogo	
		(72) Inventor:	Keiko Yamashita	
			3-43-811 Ueda-machi	
			Nishinomiya City, Hyogo	
(continued on last page)				

(54) [Title of the Invention] Oligonucleotides for Detecting *Campylobacter* Genus Bacteria, Method for Detecting *Campylobacter* Genus Bacteria and Test Reagent Kit for Detection Thereof

(57) [Abstract]

[Purpose] Provide oligonucleotides used for detecting campylobacter genus bacteria and/or pathogenic campylobacter genus bacteria directly, conveniently, quickly, specifically, and with high sensitivity.

[Constitution] Oligonucleotides for detecting campylobacter genus bacteria comprising either the nucleic acid sequence shown in sequence numbers 1 through 14 in the sequence table or the complementary sequence thereof; labeled oligonucleotides having labeled pathogenic oligonucleotides; and a method for detecting the campylobacter genus bacteria in samples using these oligonucleotides, and a test reagent kit for detection thereof.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-276999

(43) 公開日 平成5年(1993)10月26日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68	Z N A A	8114-4B		
C 0 7 H 21/04	B			
C 1 2 N 15/10				
C 1 2 Q 1/04		6807-4B		
		8931-4B	C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数6(全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平4-80769	(71) 出願人	000003160 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
(22) 出願日	平成4年(1992)4月2日	(72) 発明者	松岡 瑛 兵庫県芦屋市竹園町1-11
		(72) 発明者	香川 昌平 兵庫県西宮市東鳴尾町2-2-11-701
		(72) 発明者	大塚 則光 兵庫県西宮市里中町3-10-4
		(72) 発明者	山下 啓子 兵庫県西宮市上田町3-43-811

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 カンピロバクター属細菌検出用オリゴヌクレオチド、カンピロバクター属細菌の検出法及び検出用試薬キット

(57) 【要約】

【目的】 直接的で簡便、迅速、特異的且つ高感度なカンピロバクター属細菌および/または病原性カンピロバクター属細菌の検出に用いるオリゴヌクレオチドを提供する。

【構成】 配列表の配列番号1~14に示す核酸配列を有するか、またはそれらの相補的配列を有するカンピロバクター属細菌検出用オリゴヌクレオチド、害オリゴヌクレオチドを標識化した標識オリゴヌクレオチド、およびこれらのオリゴヌクレオチドを使用する試料中のカンピロバクター属細菌の検出法およびその検出用試薬キット。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表・配列番号1～14（但し、Aはアデニン、Cはシトシン、Gはグアニン、Tはチミンを表す。また、任意の位置のTはウラシル（U）と置換されていてもよい。）に示す核酸配列を有するか、またはそれらの相補的配列を有するカンピロバクター属細菌検出用オリゴヌクレオチド。

【請求項2】 請求項1に記載のカンピロバクター属細菌検出用オリゴヌクレオチドを標識化したカンピロバクター属細菌検出用標識オリゴヌクレオチド。

【請求項3】 請求項1に記載のカンピロバクター属細菌検出用オリゴヌクレオチドを標識化し、得られた標識核酸プローブを試料中のDNAまたはRNAと交雑させ、交雑した結合体の標識を測定することを特徴とする試料中のカンピロバクター属細菌の検出法。

【請求項4】 請求項1のカンピロバクター属細菌検出用オリゴヌクレオチドをそのまま核酸プライマーとするかまたは標識化して得られた標識核酸プライマーを、試料中のDNAまたはRNAと交雑させ、プライマー伸長させ、得られたプライマー伸長物を測定することを特徴とする試料中のカンピロバクター属細菌の検出法。

【請求項5】 請求項1のカンピロバクター属細菌検出用オリゴヌクレオチドを標識して得られた標識核酸プローブを含むことを特徴とする試料中のカンピロバクター属細菌の検出用試薬キット。

【請求項6】 請求項1のカンピロバクター属細菌検出用オリゴヌクレオチドをそのまま核酸プライマーとして含むかまたは標識化して得られた標識核酸プライマーを含むことを特徴とするカンピロバクター属細菌の増幅、検出用試薬キット。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はカンピロバクター（*Campylobacter*）属細菌を簡便かつ迅速に検出することに関する。更に詳しくは、カンピロバクター属に属する細菌の中で腸管感染症の起炎菌となる細菌を検出することに関する。

【0002】

【従来の技術】カンピロバクター属細菌は、イヌ、ヤギ、ニワトリ、ウシなどの家畜の病原菌であって、流産、下痢症などを起こすことで知られている。ヒトの下痢症の起炎菌としては主にカンピロバクター・ジェジュニ（*C. jejuni*）、カンピロバクター・コリ（*C. coli*）などが知られている。これらの細菌は食中毒原因菌として認められている。これらの細菌はもともとイヌ、七面鳥、ヤギ、ブタ、ニワトリなどの腸管に生存しており、食肉を汚染する場合もあり、食品検査の項目としても注目を集めている。食品を摂取してから発病までの潜伏期間は平均して、2～5日、症状は下痢、腹痛、発熱、嘔吐などの胃腸炎症状である。また場合によっては菌血症を起こ

2

すことがあり、臨床上重要な菌である。カンピロバクター属細菌の培養には一般にスキロー培地などの特殊な培地を用い、酸素濃度が3～10%の絶対好気性条件を必要とするなど、その培養は容易ではない。またこの細菌は死滅しやすく、材料を採取した後、2～3時間以内に検査する必要がある。一般に下痢などの患者から便検体を採取しても直ちに検査することは困難である。特に外来患者、食中毒などの場合は検体採取後1～2日経過した検体を検査することになる。これらの場合カンピロバクター属菌はほとんど死滅しており、検査結果に大きく影響することになる。最近、カンピロバクター・ピロリ（*C. pylori*）がヒトの胃・十二指腸粘膜から分離され、潰瘍との関係が論じられているが、この細菌が下痢症と関連があるとの報告はない。最近の研究ではカンピロバクター・ピロリはカンピロバクター属としては扱わないでヘリコバクター（*Helicobacter*）属として分類されている。カンピロバクター属細菌の病原性の原因は充分解明されておらず、毒素などの因子は判っていない。近年、DNAプローブをはじめとする遺伝子診断による細菌の同定や毒素遺伝子の検出が多くなされている。カンピロバクター属細菌の場合一般にリボソームRNAをコードする遺伝子がプローブとして使用されている。このリボソームRNAの遺伝子配列は既に発表されている（例えばジャーナル・オブ・バクテリオロジー *Journal of Bacteriology*; 169巻2173頁1987年）。またカンピロバクター属細菌検出用の核酸フラグメントも公知である（特開平2-84200号公報、特開平2-154700号公報、特開平3-112498号公報）。これらの配列はカンピロバクター・ジェジュニ（*Campylobacter jejuni*）、カンピロバクター・コリ（*C. coli*）の検出用であり、その他のカンピロバクター属細菌の検出には適当でない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは既に公知となっているロマニューク（*Romaniuk, P. J.*）らの文献（ジャーナル・オブ・バクテリオロジー *Journal of Bacteriology*; 169巻2173頁1987年）をもとにオリゴヌクレオチドを合成し、カンピロバクター属細菌の検出を種々検討した結果、少なくとも本邦で見られるカンピロバクター属細菌のリボソームRNAをコードする遺伝子はロマニュークらの報告と一部異なっていることを見出した。本発明の目的は、直接的で簡便、迅速、特異的且つ高感度なカンピロバクター属細菌及び／または病原性カンピロバクター属細菌の検出に用いる新規なオリゴヌクレオチドを提供することである。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らはカンピロバクター属細菌のリボソームRNA遺伝子に関して種々の検討を重ねた結果、カンピロバクター属細菌の検出に適当なオリゴヌクレオチドを得、それを用いた検出方法を確立し、本発明を完成させるに至った。更に本発明者らは

カンピロバクター・ジェジュニ(Campylobacter jejuni)、カンピロバクター・コリ(C. coli)などのヒトに対して病原性を示すと考えられているカンピロバクター属細菌のみに反応し、その他のカンピロバクター属細菌には反応しないオリゴヌクレオチドも得ることができ、それを用いた検出方法を確立し、本発明を完成させるに至った。また本発明者らはカンピロバクター・フィータス(Campylobacter fetus)のみに反応し、その他のカンピロバクター属細菌には反応しないオリゴヌクレオチドも得ることができ、それを用いた検出方法を確立し、本発明を完成させるに至った。

【0005】すなわち本発明はカンピロバクター属細菌に特異的なオリゴヌクレオチド、すなわち、配列表・配列番号1~14(但し、Aはアデニン、Cはシトシン、Gはグアニン、Tはチミンを表す。また、任意の位置のTはウラシル(U)と置換されてもよい)に示す核酸配列を有するか、またはそれらに相補的な配列を有するカンピロバクター属細菌検出用オリゴヌクレオチドおよび上記カンピロバクター属細菌検出用オリゴヌクレオチドを標識化した標識オリゴヌクレオチドである。

【0006】また本発明は病原性カンピロバクター属細菌、特にカンピロバクター・ジェジュニ(C. jejuni)、カンピロバクター・コリ(C. coli)に特異的なオリゴヌクレオチド、すなわち、配列表・配列番号1~12(但し、Aはアデニン、Cはシトシン、Gはグアニン、Tはチミンを表す。また、任意の位置のTはウラシル(U)と置換されてもよい)に示す核酸配列を有するか、またはそれらに相補的な配列を有する病原性カンピロバクター属細菌検出用オリゴヌクレオチドおよび該病原性カンピロバクター属細菌検出用オリゴヌクレオチドを標識化した標識オリゴヌクレオチドである。このようなオリゴヌクレオチドとしては、配列表・配列番号7~10、12のものが好ましい。

【0007】本発明は該カンピロバクター属細菌の特異的なオリゴヌクレオチド、すなわち配列表・配列番号1~14(但し、Aはアデニン、Cはシトシン、Gはグアニン、Tはチミンを表す。また、任意の位置のTはウラシル(U)と置換されてもよい)に示す核酸配列を有するか、またはそれらに相補的な配列を有するカンピロバクター属細菌検出用オリゴヌクレオチドを標識化し、得られた標識核酸プローブを試料中のDNAまたはRNAと交雑させ、交雑した結合体の標識を測定することの特徴とする試料中のカンピロバクター属細菌の検出法、または該カンピロバクター属細菌検出用オリゴヌクレオチドをそのまま核酸プライマーとするか、または標識化して得られた標識プライマーを試料中のDNAまたはRNAと交雑させ、プライマーを伸長させ、得られたプライマー伸長物を測定することの特徴とする試料中のカンピロバクター属細菌の増幅、検出法である。

【0008】さらに本発明は該カンピロバクター属細菌

に特異的なオリゴヌクレオチド、すなわち、配列表・配列番号1~14(但し、Aはアデニン、Cはシトシン、Gはグアニン、Tはチミンを表す。また、任意の位置のTはウラシル(U)と置換されてもよい)に示す核酸配列を有するか、またはそれらに相補的な配列を有する含有するオリゴヌクレオチドあるいは該オリゴヌクレオチドを標識化した標識核酸オリゴヌクレオチドをプローブとして含むカンピロバクター属細菌検出用試薬キットおよび上記オリゴヌクレオチドをそのまま核酸プライマーとするか、または標識化して得られた標識核酸オリゴヌクレオチドを標識核酸プライマーとして含有するカンピロバクター属細菌の増幅、検出用試薬キットである。

【0009】本発明のオリゴヌクレオチドは化学合成により調製できるので、クローン化したオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドに比べ、容易、大量かつ安価に一定品質のオリゴヌクレオチドを得ることが可能である。本発明のオリゴヌクレオチドはデオキシリボ核酸(DNA)でもリボ核酸(RNA)でもよい。リボ核酸の場合はチミジン残基(T)をウリジン残基(U)と読み替えることは言うまでもない。また合成に際して任意の位置のTをUに変えて合成を行ない、ウリジン残基を含むDNAであってもよい。同様に任意の位置のUをTに変えたチミジン残基を含むRNAであってもよい。またオリゴヌクレオチド中に欠失、挿入あるいは置換といった点突然変異や、修飾ヌクレオチドがあってもよい。

【0010】上記オリゴヌクレオチドに酵素(特公平3-64119号公報など)、発光性物質(特開昭62-39598号公報など)、蛍光物質(特開昭63-122956号公報など)、抗原(特表昭63-500007号公報など)、ハプテン(特開昭62-2164号公報、特開昭62-167793号公報など)、<sup>32</sup>P、<sup>3</sup>H、<sup>125</sup>Iなどの放射性物質、不溶性担体(特表昭63-502875号公報)などの標識を導入することにより標識オリゴヌクレオチドを得る。標識結合方法は通常の方法に従う。例えばリンカーアームを有するヌクレオチドを配列表・配列番号1~14の配列のオリゴヌクレオチドの一員として置換することにより酵素を標識化することができる(Nucleic Acids Research, 14, 6115, 1986参照)。その一例として5位にリンカーアームを有するウリジンを特表昭60-500717号公報に開示された合成法によりデオキシウリジンから化学合成し、上記オリゴヌクレオチドに導入することもできる。標識の仕方は末端標識でも、配列の途中に標識してもよい。また標識は糖、リン酸基、塩基部分への結合であってもよい。

【0011】本発明のオリゴヌクレオチドを用いてカンピロバクター属細菌を検出する場合、(1)オリゴヌクレオチドをプローブとして試料中のDNAまたはRNAと交雑させ、交雑物を検出する方法、または(2)オリゴヌクレオチドをプライマーとして試料中のDNAまたはRNAと交雑させ、DNAポリメラーゼ等により伸長反応を行い、得られた伸長物からを目的核酸を検出する

方法がある。これらの場合、上述のようにオリゴヌクレオチドに抗原、ハプテン、酵素、蛍光物質、発光物質、酵素基質、放射性物質、不溶性担体などの標識を導入することにより容易に目的物の検出が可能となる。標識オリゴヌクレオチドをプローブとして用いる場合、試料とのハイブリダイゼーション後に、標識を適当な測定法で測定することにより目的核酸を検出することができる。オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる場合、DNAポリメラーゼ等による遺伝子増幅（PCR；特開昭62-281号公報参照）を行なうことによりカンピロバクター属細菌のみの遺伝子の特異的に増幅することができる。PCRに際しては反応時に放射性標識ヌクレオチドを取り込ませる方法や、増幅産物を電気泳動により分離して特異なバンドを検出することで容易にカンピロバクター属細菌を検出することができる。また前述の標識オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いれば増幅産物を直接検出することも可能である（特開平3-43099号公報など）。

【0012】本発明のオリゴヌクレオチドは固相担体に結合して、捕捉プローブとして用いることもできる。この場合、捕捉プローブと標識プローブの組合せでサンドイッチアッセイを行ってもよいし（特開昭58-501703号公報、特開昭60-93355号公報、特開昭61-195699号公報など）、標的核酸を標識して捕捉する方法もある（特開昭63-313598号公報など）。またオリゴヌクレオチドをビオチンで標識し、ハイブリダイゼーション後、アビジン結合担体で捕捉する方法もある（特開昭61-274699号公報など）。サンドイッチアッセイにおいてはどちらか一方に本発明のオリゴヌクレオチドを用いれば、該オリゴヌクレオチドにより特異的な測定が可能となり、他方のオリゴヌクレオチドの特異性は若干低くてもなんら問\*

#### 反応液組成

オリゴヌクレオチド	5 ~ 20 pmoles
10 × T4ポリヌクレオチドキナーゼ緩衝液	10 μl
1 mM [ $\gamma$ - $^{32}$ PATP (10 mCi/ml)]	1 μl
T4ポリヌクレオチドキナーゼ（東洋紡製）	10 単位

#### 水

全量が100 μl となる量

上記のように調製した反応混合液を37℃で1時間反応させた。ここで10 × T4ポリヌクレオチドキナーゼ緩衝液とは、0.5M Tris-HCl (pH8.0)、0.1M MgCl<sub>2</sub>、0.1M 2-メルカプトエタノールを示す。

#### 【0014】実施例2

(1) カンピロバクター属細菌由来核酸を増幅するための試薬キット

以下のオリゴヌクレオチドを組み合わせ、プライマーA、B、Cとした。プライマーAは、オリゴヌクレオチド(1)と(2)、プライマーBはオリゴヌクレオチド(3)と(4)、プライマーCはオリゴヌクレオチド(5)と(6)からなる。

(a) 実施例1のオリゴヌクレオチド(1)

\*題はない。本発明のオリゴヌクレオチドまたは標識オリゴヌクレオチドを試料中のDNAまたはRNAと交雑反応させるハイブリダーゼーションバッファーとしては、例えば 5xSSC、0.5%ウシ血清アルブミン、0.5%ポリビニルピロリドン、1%ドデシル硫酸ナトリウムを含む緩衝液または 6xSSC、0.5xデンハート液、0.5% SDS、100 μg/ml牛胸腺DNAを含む緩衝液、50% (W/V)ホルムアミド、5xSSC、50mM Na-PIPES 緩衝液 (pH6.8)、1xデンハート液 (0.02% フィコール、0.02% BSA、0.02% ポリビニルピロリドン)を含む緩衝液などがある。交雑条件は、通常の条件に従う。

#### 【0013】

【実施例】以下に、本発明を実施例により具体的に説明する。

#### 実施例1

##### 各種オリゴヌクレオチドの合成

ABI社DNAシンセサイザー391型を用いて、ホスホアミダイト法にて配列表・配列番号1~14（本発明）および15~17（比較例）に示される配列を有するオリゴヌクレオチドを各種合成した。以下、配列表・配列番号1~17に示される各種オリゴヌクレオチドを、それぞれオリゴヌクレオチド(1)~(17)と呼ぶ。なお、(15)、(16)、(17)は本発明と比較するためロマンヌークラの報告した配列をもとに合成したオリゴヌクレオチドである。手法はABI社マニュアルに従い、0.2 μMスケールで実施した。各種オリゴヌクレオチドの脱保護はアンモニア水で55℃一夜実施した。精製はファルマシア社製FPLCで逆相カラムにて実施した。なお合成したオリゴヌクレオチド(7)~(17)は必要により以下の方法で5'末端に $^{32}$ P-リン酸基を結合させた。

(b) 実施例1のオリゴヌクレオチド(2)

(c) 実施例1のオリゴヌクレオチド(3)

(d) 実施例1のオリゴヌクレオチド(4)

(e) 実施例1のオリゴヌクレオチド(5)

(f) 実施例1のオリゴヌクレオチド(6)

(g) TthDNAポリメラーゼ（東洋紡製）、dATP、dCTP、dGTP、dTTP

#### (1) 検体の調製

カンピロバクター属細菌による腸管感染症が疑われる患者から糞便試料を採取し、核酸を抽出した。核酸抽出は培養菌または糞便試料をPBSに懸濁し、15,000rpm、10分間遠心処理後、200 μlの水を加え、煮沸することにより核酸を抽出した。なお、カンピロバクター属細菌の

標準株としてCampylobacter jejuni NCTC 11351 を培養し検体として用いた。

### (3) PCR

反応液90 $\mu$ l に前記核酸抽出液10 $\mu$ l、実施例1のオリゴヌクレオチド各5 $\mu$ l ずつをプライマーとして加え、カンピロバクター属細菌由来核酸の増幅を行った。反応液組成は1mM ジチオスレイトール、50mM KCl、10mM Tris-HCl(pH8.3)、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.01%(w/vol)ゼラチン、それぞれ0.2mM のdATP、dCTP、dGTP、dTTPおよびTth DNA ポリメラーゼ40単位/ml である。反応条件は次の通りである。

熱変性： 94℃、0.5 分、

アニーリング：プライマーA ((1)(2)) は、50℃、2分  
プライマーB ((3)(4)) は、65℃、2分

プライマーC ((5)(6)) は、54℃、2分

重合反応： 75℃、2分

上記熱変性、アニーリング、重合反応を30回繰り返した。これらの操作はパーキン-エルマー/シータス(Perkin-Elmer/Cetus)社のDNAサーマルサイクラーを用いて行った。

### 【0015】(4) 検出

10 $\mu$ l の反応液を2%アガロースゲル電気泳動し、エチジウムブロマイド染色した後、紫外線での蛍光を検出した。泳動の電氣的条件は、定電圧100V、時間は30分を行った。操作方法並びに他の条件はManiatisらのMolecular Cloning(1982)に記載の方法に従った。反応液の他に分子量マーカーも同時に泳動し、相対泳動度の比較により、検出されたヌクレオチド断片の長さを算出した。

### (5) 結果

患者より得られた検体のPCR産物はプライマーA ((1)(2)) では275塩基、プライマーB ((3)(4)) では240塩基、プライマーC ((5)(6)) では279塩基を示し、カンピロバクター標準株と同じヌクレオチド長を有していた。これはロマニウク(Rimaniuk, P. J. ら、Journal of Bacteriology; 169巻、2137頁、1987年)の報告した核酸配列から計算されるヌクレオチドの長さとはほぼ一致した。

### 【0016】

### 【表1】

### PCR増幅産物の塩基長

検体	プライマー		
	A ((1)+(2))	B ((3)+(4))	C ((5)+(6))
患者1	275	240	279
2	275	240	279
3	275	240	279
4	275	240	279
5	275	240	279
標準株	275	240	279

### 【0017】参考例1

#### 試薬キットの特異性の確認

実施例2の結果がカンピロバクター属細菌に特異的であることを確認するために他の細菌についても実施例2と同様の操作を行なった。他の細菌には下記表2の菌を用いた。結果は下表のごとく陰性であった。

### 【0018】

### 【表2】

核酸の由来	結果
ヘリコバクター・ピロリ	-
シトロバクター・フレウディ	-
エンテロコッカス・フェカリス	-
エンテロコッカス・クロアカエ	-
大腸菌	-
クレブシエラ・オキシトカ	-
緑膿菌	-
セラチア・マルセッセンス	-
スタフィロコッカス・エピデルミス	-
ストレプトコッカス・アガラクテ	-
病原性大腸菌	-
毒素原性大腸菌	-
サルモネラ・エンテリティディス	-

### 【0019】実施例3

(1) カンピロバクター核酸検出用プローブを含む試薬キット

50 実施例1のオリゴヌクレオチド(7)～(14)で、5'末端

に、 $^{32}\text{P}$ -リン酸基を有している核酸を含むカンピロバクター由来核酸を検出するための試薬キットを作成した。組成は1) 5'末端に $^{32}\text{P}$ -リン酸基を有している標識プローブ、2)ハイブリダイゼーション用緩衝液(5×SSC、0.5% BSA、0.5% PVP、1% SDS)からなる。

## (2) カンピロバクター属細菌の検出

上記試薬キットを用いてカンピロバクター属細菌の検出を行なった。結果を下記表3に示す。なお比較のためにロマネュークらの報告した配列から合成した(15)、(16)、(17)も用いて同時に実施した。結果は下記表3に示すごとく本発明の(7)～(14)ではそれぞれカンピロバクター属細菌を特異的に検出できたが、(15)、(16)、(17)ではどのカンピロバクター属細菌も検出できなかった。本発明の(7)～(10)および(12)ではカンピロバクター・ジェジュニ、カンピロバクター・コリを選択的に検出できる。本発明の(13)、(14)ではカンピロバクター・フィータスを選択的に検出できる。

【0020】

【表3】

70-7	C. j.	C. c.	C. l.	C. f.	C. h.
(7)	+	+	+	-	+
(8)	+	+	+	-	+
(9)	+	+	+	-	+
(10)	+	+	-	-	+
(11)	+	+	+	+	+
(12)	+	+	+	-	+
(13)	-	-	-	+	-
(14)	-	-	-	+	-
(15)	-	-	-	-	-
(16)	-	-	-	-	-
(17)	-	-	-	-	-

C. j.: *Campylobacter jejuni*

C. c.: *C. coli*, C. l.: *C. lariidis*,

C. f.: *C. fetus*, C. h.: *C. hyointestinalis*

【0021】

【発明の効果】本発明によりカンピロバクター属細菌の検出及び／またはカンピロバクター属細菌種の同定を迅速、簡便に特異的且つ高感度で実施することが可能となった。本発明のオリゴヌクレオチドは増幅反応のプライマーとしても、直接検出用のプローブとしても用いることが可能である。特に増幅反応では高い検出感度のため少量の検体からのカンピロバクター属細菌を検出するこ

とが可能で、その臨床的意義は大きい。

【0022】

【配列表】配列番号: 1

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 両形態

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の特徴

10 存在位置: 1..20

特徴を決定した方法: S

他の特徴: カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。

配列

CGCAACCCAC GTATTAGTT

20

【0023】配列番号: 2

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 両形態

20 トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の特徴

存在位置: 1..20

特徴を決定した方法: S

他の特徴: カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。

配列

GAACGTATTC ACCGTAGCAT

20

【0024】配列番号: 3

30 配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 両形態

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の特徴

存在位置: 1..20

特徴を決定した方法: S

他の特徴: カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。

40 配列

GGAGAGGCAG ATGGAATTGG

20

【0025】配列番号: 4

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 両形態

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の特徴

存在位置: 1..20

50 特徴を決定した方法: S

11

12

他の特徴：カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。

配列

GCGACCGTAC TCCCCAGGCG 20

【0026】配列番号：5

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

存在位置：1..20

特徴を決定した方法：S

他の特徴：カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。

配列

AGGACAACAG TTGGAACGA 20

【0027】配列番号：6

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

存在位置：1..20

特徴を決定した方法：S

他の特徴：カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。

配列

CCGAAAAGTG TCATCCTCCA 20

【0028】配列番号：7

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

存在位置：1..20

特徴を決定した方法：S

他の特徴：カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。 40

配列

GTACGCTAGT TGTGGGATG 20

【0029】配列番号：8

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

存在位置：1..20

特徴を決定した方法：S

他の特徴：カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。

配列

AGTCATCTCA GTAATGCACG 20

【0030】配列番号：9

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

存在位置：1..20

特徴を決定した方法：S

他の特徴：カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。

配列

TTGGGATGCT AGTCATCTCA 20

【0031】配列番号：10

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

存在位置：1..20

特徴を決定した方法：S

他の特徴：カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。 30

配列

GTACACTAGT TGTGGGGTG 20

【0032】配列番号：11

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

存在位置：1..20

特徴を決定した方法：S

他の特徴：カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。

配列

ACTGGAACG AGACACGGTC 20

【0033】配列番号：12

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状 50



13

14

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

存在位置：1..20

特徴を決定した方法：S

他の特徴：カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。

配列

GTATGCTAGT TGTGGGGTG

20

【0034】配列番号：13

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

存在位置：1..20

特徴を決定した方法：S

他の特徴：カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。

配列

CTATACTAGT TGTGCTGTG

20

【0035】配列番号：14

配列の長さ：19

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

存在位置：1..19

特徴を決定した方法：S

他の特徴：カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。

配列

AGTCACGGCA GTAATGCAC

19

【0036】配列番号：15

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

存在位置：1..18

特徴を決定した方法：S

他の特徴：カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。

配列

10 GTATACTAGT TGTGCTC

18

【0037】配列番号：16

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

存在位置：1..20

特徴を決定した方法：S

20 他の特徴：カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。

配列

AGTCACGGCA GTAATGCTCG

20

【0038】配列番号：17

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

30 配列の特徴

存在位置：1..20

特徴を決定した方法：S

他の特徴：カンピロバクター属細菌の配列と相補的な配列を有する。

配列

TTGGGATGCT AGTCATCTCA

20

フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

// (C 1 2 Q 1/04

C 1 2 R 1:01)

(72)発明者 熊谷 昇子

北海道札幌市東区北16条6-2-9 ラ  
ポール美香保A705

(72)発明者 佐藤 美雪

兵庫県神戸市垂水区神陵台4-1-55-  
307